

**L'estimation
des cholinesterases sanguines
par une épreuve sur papier :
Application au diagnostic
des intoxications
par les anticholinesterasiques**

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 23 Novembre 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Jean-Marie PITAVY

Né le 24 Octobre 1935, à Alger (Algérie)

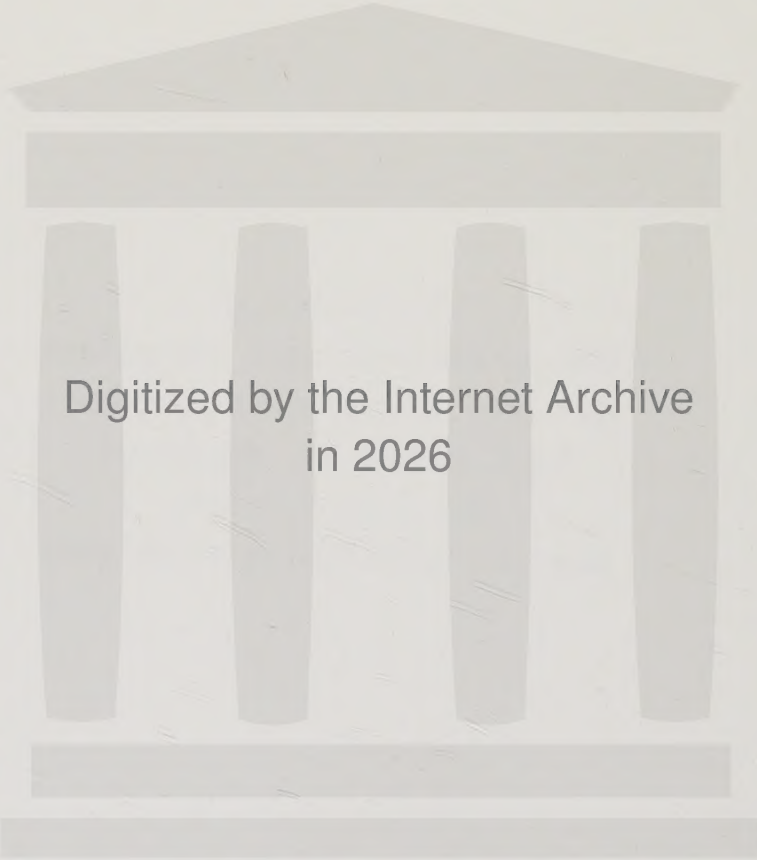


Éditions F.O.T.

LYON

1965

**L'estimation
des cholinesterases sanguines
par une épreuve sur papier :
Application au diagnostic
des intoxications
par les anticholinesterasiques**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**L'estimation
des cholinesterases sanguines
par une épreuve sur papier :
Application au diagnostic
des intoxications
par les anticholinesterasiques**

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 23 Novembre 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Jean-Marie PITAVY

Né le 24 Octobre 1935, à Alger (Algérie)



Éditions F.O.T.

LYON

1965

PERSONNEL ENSEIGNANT
de l'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE de LYON

- Directeur M. le Professeur FLORIO
- Directeur Honoraire M. le Professeur JUNG
- Directeur Honoraire M. le Professeur TAPERNOUX
- Professeur Honoraire M. le Professeur CUNY

Professeurs

15 Chaires

- 1° - Pharmacie et Toxicologie M. TAPERNOUX
- 2° - Anatomie descriptive, Extérieur, Anatomie appliquée M. BARONE
- 3° - Physiologie, Thérapeutique, Pharmacodynamie M. BOST
- 4° - Histologie, Embryologie, Anatomie pathologique M. LUCAM
- 5° - Hygiène et Industrie des Aliments d'origine animale M. FLACHAT
- 6° - Zoologie appliquée, Parasitologie externe, Parasitologie interne M. EUSEBY
- 7° - Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores -
Législation Vétérinaire M. FLORIO
- 8° - Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour .. M. COTTEREAU
- 9° - Technique chirurgicale, Pathologie chirurgicale M. COLLET
- 10° - Obstétrique, Pathologie de la Reproduction M. BERTRAND
- 11° - Pathologie Générale, Microbiologie, Immunologie M. OUDAR
- 12° - Ethnologie, Hygiène, Zootechnie, Economie rurale M. FROGET
- 13° - Botanique appliquée, Agronomie, Alimentation M. JEAN-BLAIN
- 14° - Physique et Chimie Biologiques et Médicales M. MAGAT
- 15° - Maladies contagieuses, Zoonoses, Législation sanitaire M. JOUBERT

Maîtres de Conférences

M.M. FERNEY, RUCKEBUSCH, BUSSIERAS, OUDAR.

Chefs de Travaux

MM. CHANTEGRELET, DESCHANEL, JEAN-BLAIN Claude, LAPRAS, LE NIHOUANNEN
PROY, VAN HAVERBEKE, VERINE.

Assistants

Melles DUFFOUR, GENTILLETI; MM. CAILLERE, DELATOUR, VOURET.

Examineurs de la Thèse

Président : Monsieur le Professeur ROCHE,
Premier Assesseur : Monsieur le Professeur FLORIO,
Deuxième Assesseur : Monsieur le Professeur MAGAT ,

La Faculté de Médecine et l'Ecole Nationale Vétérinaire déclarent que les
opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées
comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni im-
probation.

A MES PARENTS

Exemples de courage souriant, de sagesse et de bonté, ce faible témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance.

A MA FEMME

Tendrement

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A Monsieur le Professeur ROCHE
de la Faculté de Médecine de LYON

Qui a bien voulu présider
le Jury de notre thèse

Hommages respectueux

A Monsieur le Professeur FLORIO

Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

En témoignage de notre profonde gratitude pour
l'enseignement qu'il nous a donné.

A Monsieur le Professeur MAGAT

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

Qu'il trouve ici, avec nos remerciements pour
avoir bien voulu faire partie de notre jury de thèse,
l'expression de toute notre reconnaissance.

A TOUS MES MAITRES

DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

A Monsieur le Vétérinaire Colonel CHARY

Directeur du Centre d'Etudes et de Productions Biologiques des
Armées

A qui nous devons le sujet de cette thèse et qui nous
a aidé dans son élaboration en nous faisant profiter
de son expérience.

Nous sommes heureux de pouvoir lui témoigner ici
notre sincère reconnaissance.

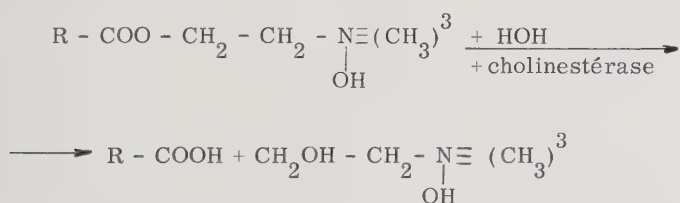
INTRODUCTION

INTRODUCTION

- GENERALITES SUR LES CHOLINESTERASES.

C'est à l'hypothèse de DALE (1914), puis aux travaux de LOEWI et NAVRATIL (1921-1926), que l'on doit la découverte puis l'identification de l'acétylcholine, et de l'enzyme responsable de son hydrolyse physiologique, enzyme que STEDMAN, STEDMAN et EASSON isolèrent du sérum de cheval en 1932 et appelèrent " choline estérase ".

Les cholinestérases forment un groupe particulier parmi les estérases carboxyliques, par leur action élective sur les esters de la choline suivant la réaction:



et leur extrême sensibilité à l'ésérine et autres poisons "anticholinestérasiques". D'éminents spécialistes se sont d'ailleurs attachés à leur étude, du point de vue enzymologique pur, parmi lesquels nous citerons : J. LEVY (1947) - K.B. AUGUSTINSSON (1948) - A. GAJDOS (1950) - D. VINCENT (1951) - E. STEDMAN (1954) - F. BERGMAN (1959). La haute sensibilité de ces enzymes aux composés "anticholinestérasiques", (et notamment aux insecticides et antiparasitaires organo phosphorés qui représentent un chapitre important de la toxicologie animale), explique l'intérêt de leur dosage dans le sang ou les tissus en vue du diagnostic des intoxications par ces composés.

De l'immense somme de travaux réalisés sur cette question, il nous faut souligner la notion établie par ALLES et HAWES (1940) : la dualité des formes de cholinestérases dans les globules rouges et le sérum sanguin (cholinestérases sériques et cholinestérase érythrocytaire) dont on peut mesurer les activités respectives à l'égard de substrats spécifiques.

On doit aussi souligner que les cholinestérases apparaissent très inégalement réparties dans presque tous les tissus et organes, et sont plus abondamment localisées dans certaines cellules ou au niveau de certaines formations histologiques, cette variabilité de répartition étant de plus, différente, selon les diverses espèces animales.

Les cholinestérases sériques ou "pseudo-cholinestérases", contrairement aux cholinestérases érythrocytaires dites "vraies", ne jouent aucun rôle dans les transmissions nerveuses; elles manquent totalement, par exemple, dans le sérum des ruminants. Elles interviendraient, par contre, dans le métabolisme intermédiaire des lipides (GAJDOS 1950) et auraient, en outre, un rôle antitoxique de protection (E. DARRASPEN, R. FLORIO et C. MAZIERE - 1952).

Bien que leur inhibition même totale par les anticholinestérasiques ne soit nullement en rapport avec l'intensité des troubles apparents de l'intoxication, l'atteinte des enzymes sériques représente une réaction spécifique et très sensible de l'atteinte d'un organisme par ces poisons. La mesure de l'activité cholinestérasique du sérum fournit donc, plus facilement que sur tout autre matériel de prélèvement, une épreuve pratique de dépistage ou de diagnostic confirmatif des intoxications par les anti-cholinestérasiques.

Nous nous sommes efforcé dans le présent travail de rechercher les conditions et les limites d'emploi d'une méthode utilisant à cette fin un simple papier réactif, et dispensant, par conséquent, du recours au laboratoire pour le diagnostic des intoxications des animaux domestiques par les composés organo-phosphorés anticholinestérasiques.

PREMIERE PARTIE

PREMIERE PARTIE

INTERET DU DOSAGE DES CHOLINESTERASES D'UN POINT DE VUE
GENERAL ET PLUS PARTICULIEREMENT EN MEDECINE VETERINAIRE
LORS D'INTOXICATIONS.

ACTION DES ORGANO-PHOSPHORES.

A - INTERET DU DOSAGE D'UN POINT DE VUE GENERAL.

Rappelons que la mesure de l'activité cholinestérasique sanguine présente un réel intérêt en médecine humaine et vétérinaire dans le diagnostic des insuffisances hépatiques et des cirrhoses; affections dans lesquelles cette activité enzymatique peut être très fortement diminuée. (VINCENT et DE PRAT - 1942) FIESSINGER, GLOMAUD et CARLOTTI - 1944) (PAGET et DHELLEMES - 1947) (DELCOURT et VANDERHOEDEN - 1954) (KEKWICK - 1960).

DARRASPEN, FLORIO et MAZIERE - (1952) ont montré notamment le parti que l'on peut tirer de cette épreuve dans l'appréciation des insuffisances hépatiques du cheval et du chien. Lors d'anémie et de leucémie, on a noté chez les humains une nette baisse de l'activité cholinestérasique, ainsi que lors de maladies fébriles, (ANTOPOL - 1937, FABER - 1943), de néphrites parfois, de choc opératoire et de crise anaphylactique (GLASSON - 1947, LABORIT - 1946), de crise nitritoïde (VINCENT - 1946), et quelquefois dans le glaucome (DESIGNES et KOPILOFF - 1959) alors que VINCENT - (1962) a constaté une hyperactivité lors de néphrose lipoiidique.

B - INTERET DU DOSAGE EN MEDECINE VETERINAIRE.

1) D'un point de vue expérimental :

Depuis l'avènement de la théorie du transport chimique de l'influx nerveux, le dosage des cholinestérasas représente une méthode de travail d'usage perma-

nent dans les recherches physiologiques consacrées aux transmissions nerveuses cholinergiques de même que dans l'étude pharmacodynamique de tous médicaments ou poisons du système nerveux autonome, notamment des composés ésériniques et organo-phosphorés inhibiteurs des cholinestérases.

Divers auteurs ont recherché les éventuelles modifications des activités cholinestérasiques sanguines en rapport avec les phénomènes immunitaires.

On note ainsi des réactions significatives dans le phénomène d'Arthus, où un abaissement de l'activité cholinestérasique érythrocytaire apparaît lors de la préparation du lapin et dans le choc anaphylactique chez le cobaye, préparé au sérum de cheval, où c'est au contraire lors de l'injection déchainante que l'on note l'abaissement de l'activité sérique.

Dans un domaine voisin, Y. et M. RUCKEBUSCH et JOUBERT (1960) ont rapporté la constatation d'une chute de 80 % des cholinestérases érythrocytaires, lors de la "prise de l'infection" par inhalation d'un aérosol de *Pasteurella pestica*, sur des porcs préparés par une malnutrition (carence de 2 mois en vitamines A. et D.).

Dans le domaine expérimental, rappelons l'observation de ANDERSON et PETHICA (1955) sur l'abaissement de l'activité des globules rouges conservés en milieu citraté glucosé, ce qui pourrait servir d'épreuve dans l'appréciation du sang destiné aux transfusions sanguines ; notons également le fait observé par GRIETEN (1956) selon lequel les spermatozoïdes du cobaye se chargent de cholinestérases au cours de leur migration dans le tractus séminal, en même temps qu'ils acquièrent la mobilité dans la portion terminale de l'épididyme, cette observation pouvant peut-être servir à contrôler le degré de maturité des semences destinées à l'insémination artificielle.

2) D'un point de vue toxicologique :

Mais l'application la plus importante de l'exploration des cholinestérases en médecine humaine et surtout en médecine vétérinaire, répond à l'action des anticholinestérasiques et plus spécialement des organo-phosphorés, responsables de nombreuses intoxications chez les animaux domestiques.

L'intérêt porté aux substances anticholinestérasiques est allé grandissant depuis les travaux de PLATTNER en 1926, montrant le pouvoir inhibiteur de l'ésérine sur la cholinestérase. Cette découverte rejoignait les connaissances déjà anciennes selon lesquelles l'ésérine renforçait les effets de l'acétylcholine.

On put penser alors que les effets de l'ésérine étaient dus au blocage de la destruction physiologique de l'acétylcholine par inactivation de la cholinestérase. Cette conclusion s'avérant exacte, ouvrait le chapitre des anticholinestérasiques.

A ces agents pharmacologiques et toxiques, le chimiste allemand G. SCHRADER en 1939, lancé dans la recherche d'insecticides de synthèse, ajou-

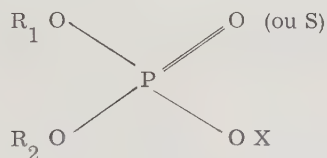
tait des composés organiques du phosphore : esters aliphatiques ou aromatiques des acides ortho, pyro, et thiophosphoriques qui ont pris, peu à peu, une place capitale dans la lutte contre les insectes ennemis des cultures, dans toutes les contrées d'agriculture intensive.

TAPERNOUX et MAGAT (1961) - RUCKEBUSCH Y. et M. (1961) - CHARY et collaborateurs (1962) ont consacré à ce sujet d'importantes publications qui nous dispensent de nous attarder très longuement sur ces esters phosphatés.

C - LES ORGANO - PHOSPHORES : LEUR ACTION.

1) Propriétés générales et toxicité :

Ces composés répondent à la configuration moléculaire générale suivante:



R_1, R_2 = substituants organiques (aliphatiques ou aromatiques)
 X = reste acylé

R_1, R_2 , et X pouvant être très divers, le nombre des combinaisons chimiques réalisables sur le modèle général ci-dessus est pratiquement infini: (esters phosphatés, phosphorates, thionophosphates, dithiophosphates).

Cependant, toutes possèdent, mais avec une intensité très inégale, la propriété biochimique fondamentale d'inactiver, de manière plus ou moins irréversible, les cholinestérases. C'est d'ailleurs à cette propriété que paraît lié leur caractère d'insecticides et d'agents neurotoxiques. Dans ces organo-phosphorés rentrent des composés que leur haute toxicité a désignés très tôt comme de redoutables armes de guerre chimique. En fait, on peut diviser les esters phosphatés anticholinestérasiques en quatre groupes correspondant à des toxicités très inégales et à des usages spécifiques.

1 - Les composés du type toxiques de guerre : (SARIN - SOMAN - TABUN...) dont les doses mortelles rapportées au kilo vif chez l'animal sont de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes

Terriblement destructeurs, ils ont été proposés comme "gaz de combat" sous la désinence allemande de "Trilons" ou l'appellation anglo-saxonne de "Nerve gas".

2 - Beaucoup moins toxiques déjà sont les composés à haute activité insecticide liée à une relative fugacité dans le milieu extérieur. (Doses mortelles de 10 à 100 milligrammes par kilo). Ils sont très utilisés dans tous les pays d'agriculture intensive, dans la lutte contre les insectes ennemis des cultures et des arbres fruitiers : Parathion, T.E.P.P., Systox, Phosdrin ...

3 - Les moins toxiques parmi les composés de ce groupe : (D.D.V.P. Dip-terex, Diazinon, Malathion...) sont souvent utilisés dans le milieu extérieur ou les habitats animaux pour la destruction des insectes nuisibles à l'élevage : (mouches, taons, moustiques, puces, tiques, etc...), commensaux indésirables, ectoparasites ou vecteurs de maladies transmissibles par piqûre inoculatrice.

4 - Depuis ces dernières années enfin : les chimistes ont obtenu des organo-phosphorés ayant une marge de sécurité pour l'animal telle, qu'ils sont employés pour lutter contre les ectoparasites, en application directe, ou contre certaines affections vermineuses, par voie digestive.

Ces toxicités différentes sont liées à la plus ou moins grande stabilité de la liaison que l'insecticide est capable de contracter avec des cholinestérases, les inhibant ainsi d'une manière plus ou moins profonde et irréversible.

2) Absorption et destinée métabolique chez l'animal :

Quelle que soit la voie d'introduction, ces produits possèdent une grande facilité de diffusion dans l'organisme.

- Deux voies d'absorption sont surtout étudiées :

a) la voie transcutanée : très rapide, mise en évidence par les accidents toxiques provoqués par les manipulations de fabrication ou d'épandage, et dont on a su tirer profit ces derniers temps dans le traitement de l'hypodermose bovine.

b) la voie buccale et digestive : caractérisée par une hydrolyse plus ou moins importante et rapide dans le tube digestif, fonction en particulier du pH gastrique.

- Destinée métabolique :

Mais quelle que soit la voie d'absorption, les organo-phosphates subissent ensuite une hydrolyse enzymatique sous l'influence des phosphatases cellulaires, réduisant au minimum les dangers d'accumulation dans les tissus. En outre, l'élimination (urinaire surtout) est rapide, et très peu de composés actifs et métabolites sont retenus dans les tissus, même passagèrement.

Le pouvoir anticholinestérasique des organes et sécrétions des animaux expérimentalement traités, disparaît très rapidement in vitro.

Les phosphates insecticides agissent donc rapidement, suivant la loi du "tout ou rien", avant d'être dégradés en produits inactifs, par des processus d'hydrolyse. Notons enfin qu'ils sont très fréquemment l'objet de conversions métaboliques. Certains d'entre eux subissent dans l'organisme des transformations

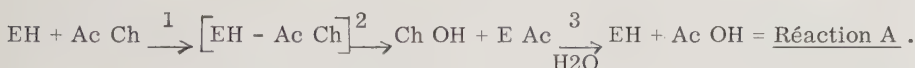
oxydatives, qui donnent naissance à des métabolites considérablement plus actifs que le produit d'origine (DIGGLE et GAGE 1951 : Parathion transformé en Paraoxon).

C'est dans le foie et vraisemblablement dans les microsomes de la cellule hépatique, grâce à des enzymes particuliers, que se font ces conversions métaboliques.

On comprend ainsi la sélectivité d'action de certains de ces produits à l'égard de telles ou telles espèces d'insectes, d'acariens ou autres parasites par exemple, ce qui permet de les employer spécifiquement pour la destruction des uns ou des autres.

3) Mécanisme d'action sur les cholinestérases :

Nous connaissons le processus suggéré par WILSON et collaborateurs, (1950) selon lequel:

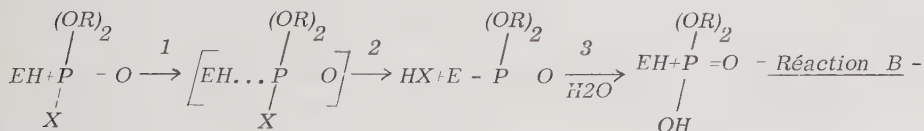


EH = enzyme ; Ac Ch = Acétylcholine -

Ch OH = choline ; Ac OH = Acide Acétique -

où les réactions 1 et 2 sont lentes tandis que la réaction 3, c'est-à-dire l'hydrolyse de l'enzyme acétylée, est rapide; la cholinestérase est alors à nouveau physiologiquement active,

L'inhibition des cholinestérases serait due à la phosphorylation de l'enzyme, réaction qui se passe comme celle de l'acétylation; mais à l'encontre de la réaction A, la phase 3 de la réaction B, l'hydrolyse de l'enzyme phosphorylée, est lente, quelquefois nulle, de sorte qu'il y a accumulation dans l'organisme de l'acétylcholine qui continue à être libérée à partir du précurseur.



Celle-ci exerce une action toxique au niveau des organes à innervation parasympathique, qui se traduit par le tableau symptomatique classique des intoxications par les insecticides organo-phosphorés, SCHAUmann (1959). Le degré de toxicité des inhibiteurs est probablement, en grande partie, dû à la stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse, de l'enzyme phosphorylée formée (équation B).

C'est donc cette stabilité qui rendrait compte du pouvoir anticholinestérasique d'un composé donné (CHEYMOL - CHABRIER - CARAYON - GENTIL - 1963).

4) Symptomatologie des intoxications par les organo-phosphorés :

a) Généralités :

C'est en particulier aux travaux de RADELEFF et collaborateurs (1963) que l'on doit de mieux connaître la dépression de l'activité des cholinestérases due à l'action des phosphates organiques à doses thérapeutiques, toxiques ou mortelles. Ainsi, les valeurs représentatives de l'inhibition des cholinestérases sanguines, enregistrées dans ces conditions, confirment l'existence constante et la sensibilité de cette réaction chez l'animal traité ou intoxiqué par l'organo-phosphate.

On peut noter des inhibitions de 20 à 75 % par rapport à l'activité cholinestérasique initiale, sans qu'il y ait apparition de quelque trouble, après absorption de doses thérapeutiques.

Par contre, une inhibition totale de l'activité sanguine signe une atteinte plus sévère, rencontrée généralement dans les intoxications graves ou mortelles.

Cependant, des traitements répétés peuvent entraîner ces mêmes résultats, même en l'absence de troubles cliniquement décelables (HEYMANS 1951: injections quotidiennes de di- isopropyl - fluorophosphate à un chien).

C'est pourquoi, s'il y a un parallélisme assez étroit entre la dose du toxique administré et la sévérité de l'atteinte enzymatique, il n'y a pas de corrélation entre le taux d'inhibition des cholinestérases sanguines et l'intensité des troubles apparents: il faudrait pour cela doser les cholinestérases spécifiques dans les tissus nerveux. Les troubles, s'ils surviennent, apparaissent 24 à 36 heures après l'absorption du phosphate organique. Ils évoluent rapidement.

La gravité sera variable selon la toxicité du composé, et l'on distinguera aisément l'allure foudroyante des intoxications provoquées par l'absorption accidentelle des insecticides destinés au traitement des végétaux, et l'évolution clinique beaucoup plus graduelle due à l'intoxication par les composés antiparasitaires pour animaux. Notons en outre que les symptômes ne sont pas identiques dans toutes les espèces et dans tous les cas. Pourtant il apparaît généralement, avec des dominantes variables, une association de troubles neuro - moteurs, digestifs et respiratoires.

b) Symptômes :

Hypersalivation, diarrhée, vomissements (chez le chien), indigestion aiguë et météorisation (chez les ruminants), coliques intestinales, sont souvent observées. Les troubles neuro-musculaires : prostration, raideur de la démarche, tremblement, fasciculations musculaires, vacillation, parésie ou paralysie du train postérieur, incoordination, torpeur chez les oiseaux, convulsions chez le chien, sont les signes les plus caractéristiques des perturbations cholinergiques produites par les esters phosphatés anticholinestérasiques.

De même : la détresse respiratoire aiguë, l'oppression, la dyspnée des animaux gravement atteints.

Les signes vago-mimétiques : myosis, ralentissement du coeur et du pouls, quoique inconstants, sont parfois très nets. Ils peuvent être quelquefois inversés par des réactions secondaires nicotiniques.

Cette étude succincte des phosphates organiques et de leur action sur les cholinestérases nous amène à envisager, maintenant, les méthodes de détermination de ces variations d'activité cholinestérasique.

DEUXIEME PARTIE

DEUXIEME PARTIE

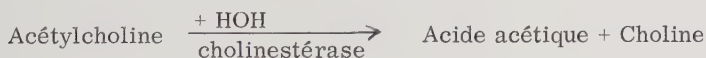
METHODES DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE.

A. CHOIX D'UNE METHODE.

La mesure de l'activité cholinestérasique est compliquée, chez les animaux, du fait que cholinestérase vraie et pseudo-cholinestérases diverses se trouvent associées en proportions variables pour exercer des activités estérasiques globalement très inégales.

Le grand nombre des méthodes proposées pour le dosage des cholinestérases dans les milieux biologiques est précisément le reflet de ces difficultés. AUGUSTINSSON a fait, à ce sujet, un exposé critique important dans l'ouvrage de GLICK "Methods of Biochemical analysis" (1957)...

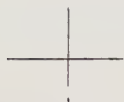
En fait, dans la plupart des cas étrangers à toute investigation d'enzymologie pure, l'objectif du dosage des cholinestérases n'exige pas une spécificité biochimique absolue. Et dans la pratique courante, il est fait rarement usage des substrats électifs que sont l'acétyl β méthylcholine et la butyrylcholine, qu'hydrolysent respectivement, de façon exclusive ou préférentielle, la cholinestérase vraie et les pseudo-cholinestérases. D'une façon générale, la mesure s'effectue in vitro et repose sur l'appréciation de la quantité d'acétylcholine détruite, dans l'unité de temps, par un volume unitaire de plasma, dans les conditions optimales de la réaction classique :



Cette quantité peut être mesurée par estimation de la quantité d'acide formée dans l'hydrolyse, ou au contraire, par soustraction de l'acétylcholine non détruite au bout d'un temps donné. Dans le premier cas, l'opération se ramène à une mesure acidimétrique, titrimétrique, ou pHmétrique. Dans le second, elle met à profit la réaction que donne l'acétylcholine traitée par l'hydroxylamine et le perchlorure de fer, (HESTRIN - 1949), réaction qui se prête facilement à une mesure photo-colorimétrique.

Nous considérerons donc rapidement ces diverses méthodes, dont les principes sont traduits par le résumé suivant emprunté à CHARY - BOCQUET et JAYOT (1961).

Acétylcholine
ou autres substrats
spécifiques :
acétyl - A - méthylcholine
ou butyrylcholine (1)



Cholinestérases
(sang, plasma, hématies,
homogénéisats
de divers tissus)



choline



Acide acétique

Réaction mise en jeu

Modes d'appréciation
de l'activité
enzymatique

1 - en présence d'hydroxylamine et de FeCl_3 :
dosage de l'acétylcholine non hydrolysée.
Méthodes colorimétriques HESTRIN (1949).
FLEISHER et collaborateur (1955) - VINCENT
et SEGONZAC (1959) - RUCKEBUSCH et
MAGAT (1961).

2 - Mesure du CO_2 formé en milieu tamponné bicar-
bonaté.
Méthode gazométrique d'AMMON (1935)
(Méthode de référence).

3 - Acidification du milieu .

A) mesures titrimétriques.

a - indicateurs colorés : HALL et LUCAS
(1937); VINCENT, SEGONZAC et DE
PRAT (1944).

b - Electrotitrimétrie GLICK (1937).
DELAUNOIS ET CASIER (1946).

B) mesure de l'Acidité ionique :

a - indicateurs colorés : LIMPEROS et
RANTA (1953) COX et collaborateurs
(1958) CHARY et collaborateurs (1961).

b - mesure électrophométrique :
MICHEL (1949) - FRAWLEY et collabo-
rateurs (1952) - HANSSON (1956) -
RUCKEBUSCH (1959).

(1) chlorures ou iodure de.

Dans les laboratoires d'analyses médicales et vétérinaires cette liste s'est, à l'usage, circonscrite aux méthodes suivantes :

1) Méthode colorimétrique à l'hydroxylamine et au perchlorure de fer

HESTRIN (1959) - RUCKEBUSCH et MAGAT (1961) ont donné de cette technique, recommandée chez les bovins qui ne possèdent pas de cholinestérases sériques, une description détaillée dans les Fiches Techniques du Syndicat National des Vétérinaires. Une adaptation, en micro-méthode, de cette technique, exécutable sur une simple goutte de sang total, a été récemment décrite par R. TRUHAUT et H. VERNIN (1964) : elle paraît susceptible de rendre de grands services dans le diagnostic des intoxications chez les animaux.

2) Méthode potentiométrique de MICHEL (1949) :

HANSSON (1956) a précisé les conditions d'application de cette méthode au dosage des cholinestérases chez les animaux. Elle nécessite l'emploi d'un pH mètre précis.

3) Méthodes pH colorimétriques :

Elles dérivent de la méthode initialement proposée par LIMPEROS et RANTA (1953) pour le contrôle des cholinestérases des personnels employés à l'épannage des insecticides. L'indicateur coloré le plus souvent utilisé est le bleu de bromothymol, dont la zone de virage correspond aux valeurs des pH habituellement mesurés dans le dosage des cholinestérases sanguines. CHARY et collaborateurs (1961) ont donné de cette méthode, applicable sur le terrain, une variante adaptée à l'estimation de la cholinestérase sanguine des bovins.

Il est clair qu'une méthode, fondée sur le changement de teinte d'un papier imprégné d'un indicateur coloré, ne peut être utilisée que sur du sérum, le sang total ou les hématies rendant impossible, par leur coloration propre, la lecture du changement de teinte du papier indicateur.

C'est pourquoi nos essais ont porté exclusivement sur l'estimation des cholinestérases du sérum du cheval. Les résultats obtenus, à l'aide du papier indicateur, ont été systématiquement confrontés à ceux fournis par la méthode pH-métrique de MICHEL (variante de HANSSON) .

B. METHODE CHOISIE .

La méthode électrophométrique de MICHEL (et sa variante selon HANSSON - 1956) .

Cette méthode a été mise au point pour fournir un procédé plus pratique que la classique méthode manométrique d'AMMON. Elle ne nécessite qu'un appareillage généralement disponible dans un laboratoire moyen, au lieu des appareils spécialisés nécessaires jusqu'alors : (manomètre de WARBURG) .

Le principe de la méthode est fondamentalement le même que celui utilisé

dans toutes les méthodes chimiques qui ont été indiquées. La vitesse de l'hydrolyse de l'acétylcholine, par l'échantillon enzymatique à éprouver, est ici mesurée par l'abaissement de pH, provoqué en 1 heure, en milieu convenablement tamponné, par la libération d'acide acétique.

Cependant, cette méthode ne donne des résultats très satisfaisants que pour le sang de l'homme. Appliquée aux constituants du sang des animaux, on constate en effet, que les conditions d'opération, proposées par MICHEL, sont inadéquates à mesurer des activités aussi faibles que celles du plasma du porc ou des hématies du cheval, à l'état normal, et qu'à plus forte raison, les mesures ne pourront plus être faites avec sécurité, si l'activité sanguine est partiellement inhibée, chez des animaux malades ou intoxiqués, par un anticholinestérasique.

Il apparaît donc que la mesure de l'activité des cholinestérases étant liée au respect des conditions optimales d'hydrolyse du substrat (pH, concentrations relatives de l'enzyme et du substrat), les activités enzymatiques les plus faibles ne peuvent se manifester sans ambiguïté que si l'on modifie les conditions de la réaction de titrage, en adaptant la méthode de mesure, quelle qu'elle soit, à la richesse enzymatique des tissus et des espèces auxquels on s'adresse.

C'est pourquoi nous avons utilisé dans nos essais, comme méthode de référence, la variante de la méthode de MICHEL, décrite par HANSSON en 1956. Nous l'exposons donc en détail ci-après.

Cette méthode nous paraît être la plus avantageuse au laboratoire, du fait qu'elle est électro-pHmétrique : simplicité, un minimum d'appareillage et la possibilité de réaliser un grand nombre de déterminations, dans un temps relativement court, sont son lot. On effectue facilement les lectures de pH en 1 minute, pour chaque échantillon. Il est donc possible de réaliser une grande série de déterminations, en quelques heures, en ajoutant le substrat aux échantillons, à des intervalles d'une minute.

La parfaite validité des résultats obtenus est d'ailleurs attestée par les travaux de RUCKEBUSCH en 1959, CHARY et collaborateurs en 1961, sur les hématies, le sang total ou le sérum du boeuf, du porc, du cheval et du chien.

1) PRINCIPE DE LA METHODE :

L'activité enzymatique est mesurée à 25° C, en milieu convenablement tamponné, par l'abaissement du pH résultant de l'hydrolyse de l'acétylcholine (chlorure ou iodure ou tout autre substrat spécifique de la série des esters de la choline) produite par les cholinestérases d'une quantité déterminée de plasma dilué.

Les mesures sont faites à l'aide d'un pH mètre à électrode verre-calomel, et à lecture au 1/100 d'unité pH.

2) REACTIFS :

a) solution tampon :

Barbital sodique	4, 1236 g.	(	à diluer au 1/3
Po 4 H2 K	0, 5446 g.	(	
K Cl	44, 7300 g.	(	pour l'emploi
H ClN/10	28 ml.	(	
eau bidistillée qsp.	1.000 ml.	(	

(pH à 25° C = 8,05 - 8,10 (à vérifier avant chaque mesure).

Conservation 1 semaine à + 4° C (ajouter quelques gouttes de toluène pour stabiliser).

b) solution de substrat :

Chlorure d'acétylcholine : solution aqueuse à 14,7741 mg/ml.

Conservation 5 jours à + 4° C.

c) préparation enzymatique à titrer :

Le plasma est préparé à partir du sang recueilli dans une seringue dont les parois sont préalablement mouillées d'une solution aqueuse fraîche d'héparine à 25 mg/ml, et après centrifugation (30 minutes à 4.000 tours), dilué au tiers.

3) MODE OPERATOIRE :

Le pH mètre étant préalablement réglé et étalonné sur une solution tampon de référence à pH 7, les réactifs sont distribués dans des godets de matière plastique aux trois-quarts immergés dans un bain-marie à 25° C, godets dans lesquels on effectue les mesures pHmétriques.

a) Dans un godet, ajouter successivement et mélanger :

3 ml de solution tampon (diluée au tiers).

2,4 ml d'eau bi-distillée.

0,6 ml de préparation enzymatique (plasma dilué).

Laisser au repos 15 minutes, jusqu'à ce que le mélange soit équilibré à 25° C .

b) Ajouter alors et mélanger rapidement 0,6 ml de la solution de substrat. Noter l'heure (T1) et mesurer immédiatement le pH initial du milieu au départ de la réaction enzymatique (pH 1).

c) Mesurer ensuite le pH de 15 en 15 minutes jusqu'à 30 minutes. 1 heure ou 1 heure 30 (T2, pH 2).

Note: pour la commodité de nos mesures, étant donné que nous opérons simultanément sur plusieurs plasmas, nous faisons nos lectures de pH aux temps 0, 30 minutes et 1 heure.

- d) On prépare séparément 1 godet témoin dans lequel la préparation enzymatique est remplacée par 0,6 ml d'eau bidistillée. Ce témoin sert à mesurer la variation de pH (d), due à l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine dans les mêmes conditions de réaction.

4) MODE D'EXPRESSION DES RESULTATS :

L'activité cholinestérasique est mesurée par la vitesse d'acidification du milieu, c'est-à-dire par la grandeur de la variation horaire du pH (Δ pH exprimé en unités pH) que l'on mesure généralement à 30 ou 60 minutes, sans omettre de retrancher la variation (d), due à l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine et mesurée dans le godet témoin.

TROISIEME PARTIE

TROISIEME PARTIE

EXPERIMENTATION

Nous nous sommes personnellement attaché à étudier les conditions d'utilisation et la validité des résultats obtenus, par l'emploi d'un papier réactif imprégné d'un substrat hydrolysable et d'un indicateur coloré (1), dans l'estimation des cholinestérases plasmatiques du cheval.

Dans une première série d'essais, nous avons mis au point les conditions d'emploi permettant d'obtenir une lecture correcte des variations de teinte du papier réactif, compte tenu de l'activité enzymatique particulière du plasma du cheval. Nous nous sommes inspiré, à ce sujet, des recherches de D. VINCENT, G. SEGONZAC et M.C. MARQUES - VINCENT (1963) sur l'utilisation de ce papier réactif pour le sérum humain.

Dans un second temps, nous avons vérifié la concordance, des indications données par le papier réactif, avec les résultats de la mesure des cholinestérases par la méthode pH métrique de HANSSON (1956) sur le cheval normal.

Enfin, nous avons étudié les indications données par le papier réactif, dans l'estimation de l'activité cholinestérasique du sérum de chevaux, ayant préalablement reçu un anticholinestérasique.

(1) Papier " Acholest " imaginé par SAILER et BRAUNSTEINER (1959), dont les Laboratoires Delagrange, à qui nous exprimons nos remerciements, ont bien voulu nous fournir l'échantillonnage nécessaire.

A - PRINCIPE ET MODE D'UTILISATION DU PAPIER REACTIF :

1) Au contact de la cholinestérase du sérum, l'ester de la choline qui imprègne le papier est hydrolysé, ce qui provoque une acidification et le virage de l'indicateur coloré. On estime ici le temps nécessaire pour que le papier vire jusqu'à une teinte déterminée : délai d'autant plus court que l'hydrolyse est rapide, c'est-à-dire que l'activité cholinestérasique du sérum est élevée . Et inversement.

2) Matériel :

- Papier test (jaune) et papier témoin.
- Lame porte-objet.
- Pipette de 0,05 ml.
- Chronomètre.

3) Mode opératoire :

- Couper transversalement les bandes de papier réactif.
- Au centre d'une lame très propre (exempte de trace d'acide ou d'alcali), déposer 0,05 ml de plasma exempt de globules rouges ou de traces d'hémolyse.

Ce volume doit être mesuré avec précision car la réaction est quantitative.

- Placer sur le plasma une demi-bande de papier réactif et déclencher le chronomètre.

Quand l'absorption est totale, recouvrir d'une seconde lame porte-objet. Il faut alors presser, à plusieurs reprises, pour obtenir une répartition régulière du liquide dans le papier réactif et chasser les bulles d'air incluses.

La seconde lame est maintenue jusqu'à la fin de l'épreuve, pour éviter l'évaporation.

Le papier réactif, primitivement jaune, devient bleu-vert au contact du sérum et reprend sa couleur jaune primitive en passant par des nuances intermédiaires. Le jaune verdâtre des papiers de référence est caractéristique.

Le temps nécessaire pour obtenir cette teinte permet de déterminer l'activité de la cholinestérase.

B - ESTIMATION DE L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE SERIQUE NORMALE DU CHEVAL :

Nous nous sommes intéressé à un lot de 64 chevaux de selle, Français et

Anglo-Arabes, de l'effectif équin du C.I.S.B.V.A. et d'écuries de Sport hippique.

Nous avons eu ainsi des résultats, sur des chevaux dits " civils " et des chevaux dits " militaires ", ce qui nous a permis de constater d'ailleurs, que leurs activités cholinestérasiques respectives étaient similaires, aux écarts individuels près, malgré leur régime et leur rythme de vie différents.

1) Dosages par la méthode ElectropHmétrique :

Nous avons effectué nos mesures suivant la méthode de HANSSON, décrite plus haut. Les lectures ont été faites aux temps 0, 30 minutes et 1 heure et nous avons calculé les Δ pH traduisant l'activité cholinestérasique du sérum considéré, à 30 minutes et 1 heure, en soustrayant la valeur du pH, indiquée par le pHmètre, au bout de 30 minutes et 1 heure de celle indiquée au temps 0. Le résultat obtenu a été, bien entendu, diminué de la variation à 30 minutes et 1 heure, due à l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine, mesurée dans le godet témoin.

Ainsi, par exemple, la jument française " KERMESSE ", âgée de 11 ans, nous a fourni les chiffres suivants:

Résultats pHmétriques :

- de la solution contenant sérum + acétylcholine :

au temps 0 = 7,95 - à 30 minutes = 7,01 - à 60 minutes = 6,38.

- et de celle où il n'y avait que l'acétylcholine (godet témoin), sans sérum:

au temps 0 = 7,96 - à 30 minutes = 7,93 - à 60 minutes = 7,91.

Et par conséquent:

le Δ pH traduisant l'activité cholinestérasique du sérum de Kermesse est :
à 30 minutes = 0,91 et à 60 minutes = 1,52.

Nous avons ainsi constaté que, sur l'ensemble des mesures effectuées sur notre lot équin, les valeurs extrêmes du Δ pH à 30 minutes ont été : 0,78 et 1,30 et celle du Δ pH à 60 minutes ont été : 1,28 et 1,90.

Nous avons alors calculé la moyenne arithmétique de nos Δ pH à 30 minutes: $X = 1,05$, ce qui rejoignait les résultats de R. CHARY et collaborateurs (1959), et suivant la formule des calculs statistiques, l'écart quadratique moyen ou écart type :

$$s = \frac{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}{n - 1}$$

(X = 1 mesure expérimentale)

($\bar{X}$ = moyenne arithmétique)

(n = nombre des mesures)

$$s = 0,1515$$

Ce qui représente un écart de $1/7$ ème, en plus ou en moins de la valeur moyenne 1,05 obtenue.

Ces chiffres étant conformes, aux variations individuelles près, à ceux fournis par les spécialistes de cette question, nous avons parallèlement, avec les mêmes sérums, effectué les mesures d'activité cholinestérasique avec le papier réactif "Acholest".

2) Estimation comparée à l'aide du papier réactif :

Notons, tout d'abord, que ce papier a été expérimenté et mis au point et par conséquent "étalonné" avec des sérums humains.

Nous avons donc cru bon, avant de commencer tout dosage, de comparer les teintes prises par le papier, depuis le début de la réaction et pendant toute la durée de celle-ci, avec des sérums humains et équins.

Simultanément, nous avons noté les temps mis par chaque sérum pour faire virer le papier à la couleur de référence.

Ainsi, conformément à la notice accompagnant le papier, nous avons pu constater que le sérum humain, que nous avons utilisé, répondait bien aux normes établies en couleur et en temps. En comparaison, les couleurs prises par le papier, avec du sérum équin normal, étaient identiques et seuls les temps d'obtention de ces couleurs étaient allongés dans ce cas, ce qui est normal puisque le sérum humain est beaucoup plus riche en cholinestérase que le sérum équin.

C'est alors que nous avons soumis les sérums normaux de nos 64 chevaux à la méthode au papier réactif.

Nous avons ainsi relevé, pour obtenir le virage à la couleur de référence du papier témoin, des valeurs extrêmes, en minutes, égales à 10 minutes et 32 minutes ; soit en notation $1000/\text{minutes} = 100$ à 31,2.

Les valeurs les plus nombreuses se situant entre 15 minutes et 25 minutes, soit en $1000/\text{minutes} = 66$ à 40.

La moyenne étant par conséquent de 20 minutes 24 secondes, soit 21 minutes par excès, ou en $1000/\text{minutes} = 47,6$.

L'écart type, pour notre effectif, se trouvait donc être de 5 minutes, ce qui correspondait à un écart de $1/4$ en plus ou en moins de la valeur moyenne obtenue.

Nous pouvions donc, d'ores et déjà, conclure, que cette méthode au papier réactif s'avérait nettement plus imprécise que la méthode électrophométrique de HANSSON. La suite de l'étude expérimentale nous permettra d'en juger l'importance dans le diagnostic des intoxications.

Cependant, nous rapportant à l'étude de D. VINCENT - G. SEGONZAC

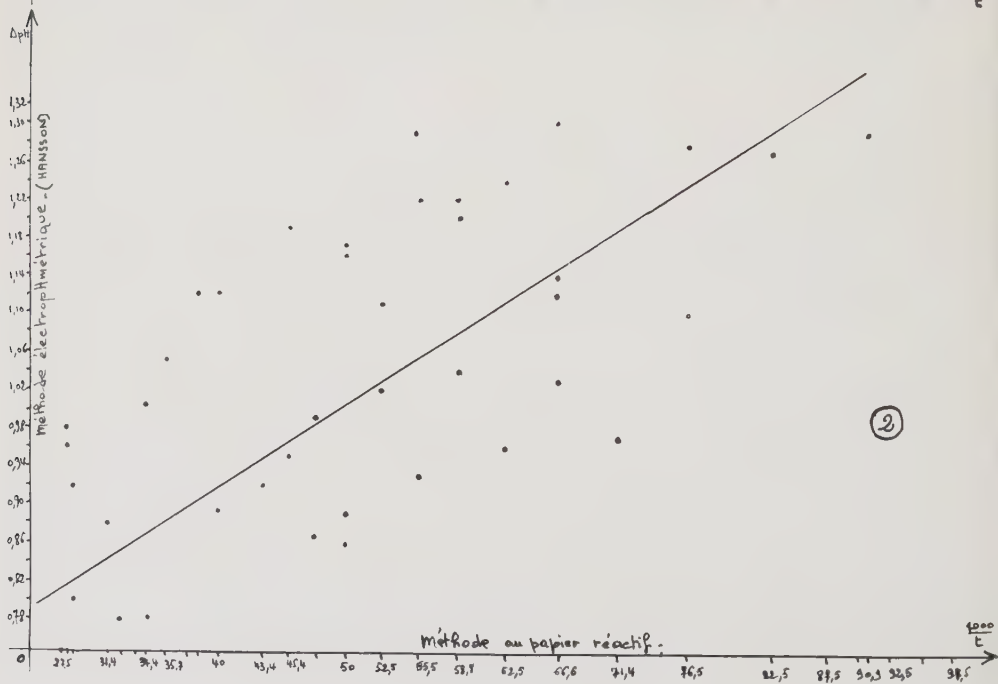
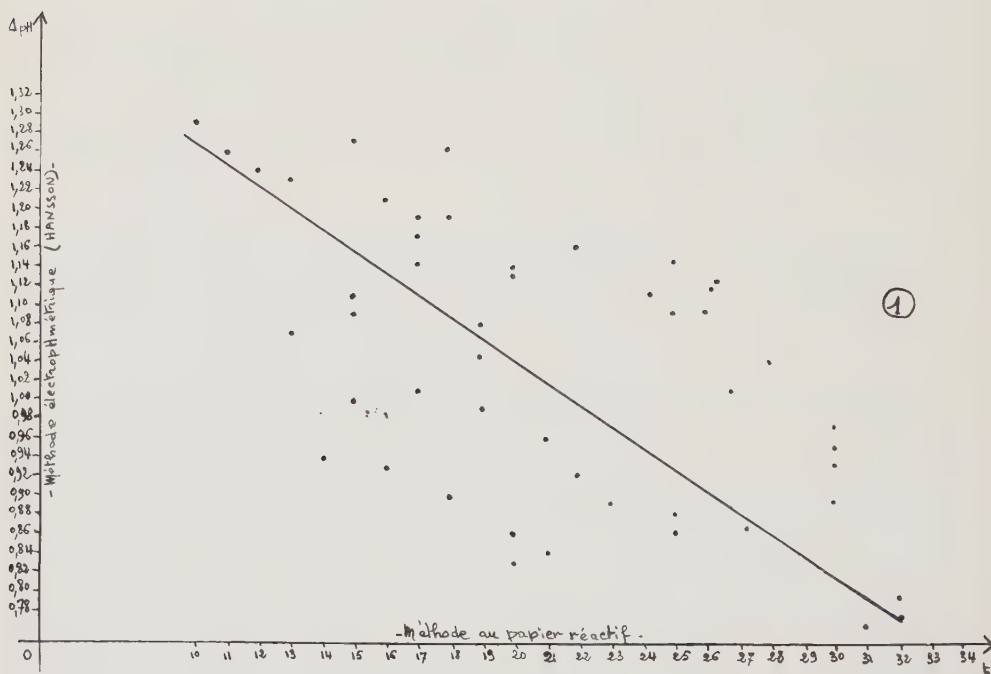
et Mme M.C. MARQUES - VINCENT (1963), nous avons constaté, comme eux, que la teinte initiale obtenue variait souvent considérablement; ceci étant dû à des variations du pH initial du sérum, au cours des heures et des jours qui suivent son prélèvement.

Aussi, nous sommes nous très vite attaché à opérer nos mesures le plus rapidement possible, dans les quelques heures suivant la prise de sang.

Dans ce cas, nous avons, pratiquement toujours, obtenu la teinte vert-bleu initiale. Il est donc important de souligner le rôle du pH initial, et surtout, dans la technique des mesures, la nécessité de les opérer le plus rapidement possible après la prise de sang. (Précisions qui ne sont pas fournies par la notice accompagnant le papier réactif) .

Enfin, nous nous sommes rangé à l'avis des auteurs précédemment cités, en admettant que des écarts non négligeables, dans les mesures, étaient dus à l'importance du système tampon du sérum d'une part, puisque celui-ci freine l'acidification, et d'autre part, à celle de la protidémie, puisque, par leur caractère amphotère, les protéides manifestent un pouvoir tampon considérable. Toutefois, nous semblons avoir été moins gênés par ces variations et ce, du fait de la moins grande activité cholinestérasique du sérum équin par rapport au sérum humain.

Il était alors logique que les écarts fournis par nos mesures fussent moins importants.



3) Résultats comparés:

Nous avons tenu à grouper l'ensemble des résultats de nos mesures sur deux courbes. L'une (1), exprimant les temps mis par le papier pour virer à la couleur de référence, en fonction des Δ pH obtenus avec les différents sérums et l'autre, (2) substituant aux temps considérés ci-dessus, des unités d'activité du type 1000/t, comme l'a proposé RICHTERICH (1962).

Ces deux courbes, nous donnant des résultats approximativement concordants puisque nous y constatons une répartition assez proche et régulière de l'ensemble des points, de part et d'autre de la droite idéale. Nous avons poursuivi notre expérimentation, en tentant l'inhibition de la cholinestérase sérique au moyen de produits pharmacodynamiques.

C - MESURE DE L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE SERIQUE APRES ACTION D'UN ANTICHOLINESTERASIQUE:

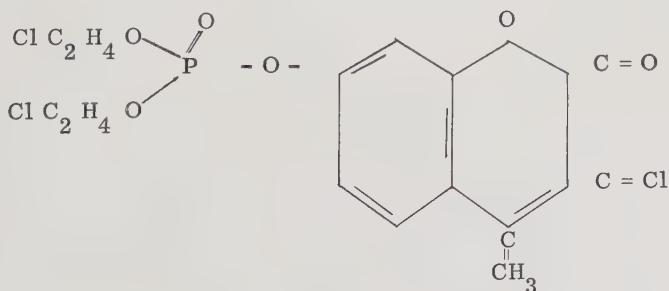
Conservant les méthodes de mesure que nous avons décrites au chapitre précédent, nous avons mené notre expérimentation en deux temps :

Dans un premier temps, nous avons tenté d'inhiber l'activité cholinestérasique d'un sérum de cheval, à l'aide d'un parasymphomimétique de synthèse, inhibiteur des cholinestérases : la PROSTIGMINE.

Puis dans un deuxième temps : à l'aide d'un organo-phosphoré, utilisé comme antiparasitaire interne chez les ruminants sous forme de poudre mouillable, et commercialisé sous le nom de GALLOXON * par les Laboratoires ROUSSEL.

Ce produit a pour principe actif (77 %) : l'haloxon, découvert par N.C. BROWN et collaborateurs (1962), qui répond à la formule =

0,0 di - (2 - chloréthyl) 0 - (3 - chloro - 4 - méthyl - coumarin - 7 - yl) phosphate;
soit en formule développée :



* GALLOXON - Laboratoires ROUSSEL - Département vétérinaire - Paris . Nous remercions bien sincèrement les Laboratoires Roussel qui nous ont fourni un échantillon important de Galloxon, pour la réalisation de nos expérimentations, et une documentation très complète sur l'Haloxon.

1) Mesure de l'activité cholinestérasique d'un cheval après une injection de Prostigmine.

a) Matériel et technique : Nous avons choisi comme animal d'expérience, un cheval hongre de 11 ans, en excellente santé, qui, outre ses caractères physiologiques normaux, présentait une activité cholinestérasique sérique normale très voisine de la moyenne que nous avons définie, soit Δ pH à 30 minutes égal à 0,90 et temps pour obtenir la couleur de référence sur le papier réactif égal à 20 minutes.

Nous lui avons injecté, une première fois, par voie sous-cutanée, 6 mg de Prostigmine. Cette quantité n'entraîna aucune variation d'activité cholinestérasique notable.

En effet, le Δ pH, que nous avons alors calculé, variait de 0,85 après 1/4 d'heure à 0,64 au bout de 2 heures.

Nous obtenions, simultanément, le virage du papier à la couleur de référence au bout de 24 minutes.

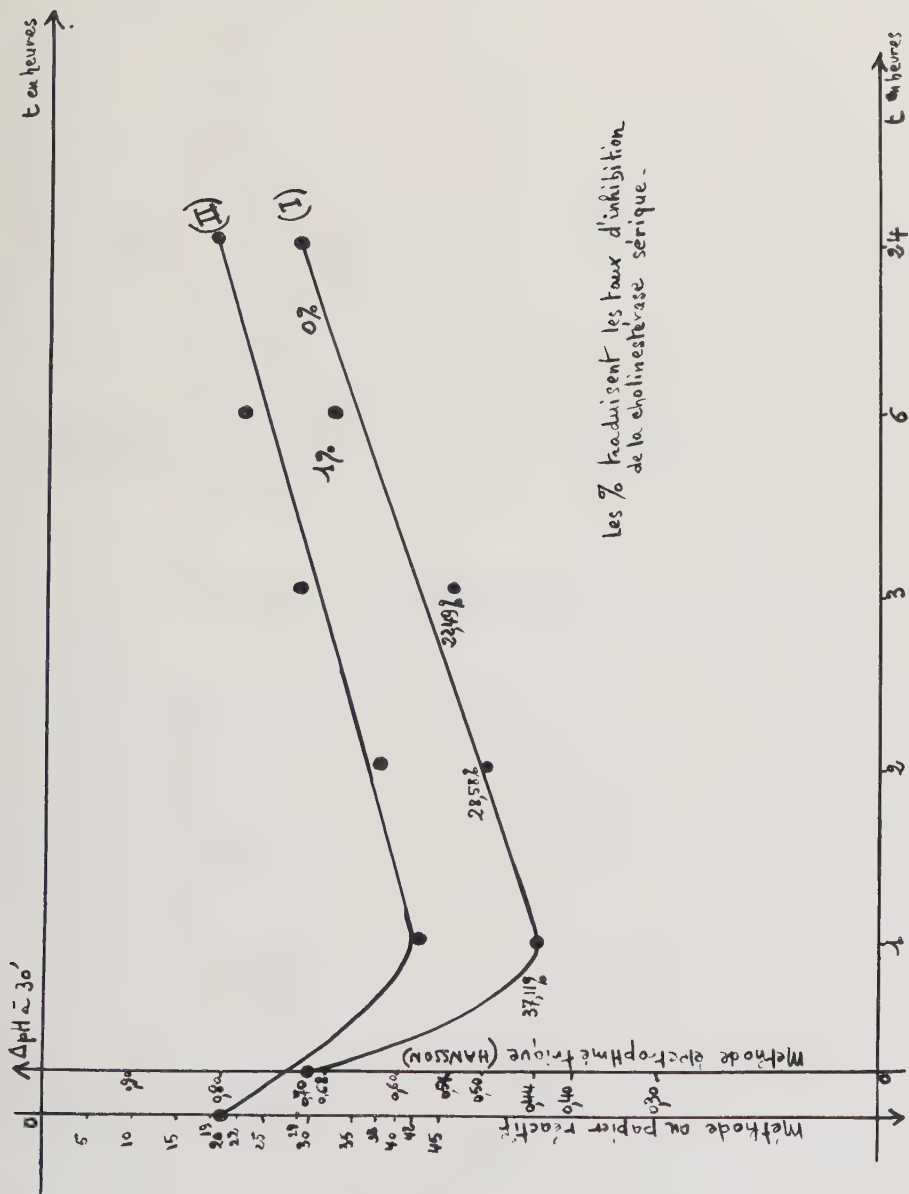
Après un repos de quelques jours, nous avons repris la même expérience, mais en injectant, cette fois, au cheval: 12 mg de Prostigmine, par voie sous-cutanée.

Nous avons alors effectué des mesures de l'activité cholinestérasique au bout de 1, 2, 3, 6 et 24 heures et nous avons obtenu des résultats traduisant une atteinte nette de cette activité.

Nous avons groupé ces résultats sur deux courbes comparatives :

La première courbe, (1), représente les résultats obtenus avec la méthode électrophométrique, le Δ pH étant calculé à 30 minutes.

La deuxième courbe, (II), ceux obtenus par la méthode au papier réactif.



b) Résultats comparés : Les courbes obtenues montrent que, lorsqu'on injecte le produit anticholinestérasique, c'est autour de la première heure que l'effondrement de l'activité cholinestérasique est le plus net, le taux de cholinestérase reprenant pratiquement sa valeur initiale en 6 heures environ.

Le calcul des taux d'inhibition nous a permis de préciser encore la valeur de cet abaissement de l'activité cholinestérasique et de la comparer aux résultats obtenus avec la méthode au papier réactif. Ainsi, autour de la première heure qui suit l'injection, pour un abaissement de 37,11 % de l'activité cholinestérasique sérique moyenne, nous avons observé le virage du papier à la couleur de référence en 42 minutes, ce qui représente un temps nettement supérieur aux chiffres extrêmes retenus lors des dosages de sérums normaux, (20 minutes en moyenne). Ces premiers résultats nous ont encouragé à poursuivre notre expérimentation. Nous avons, en effet, entrevu la possibilité de révéler, grâce aux variations du temps de coloration du papier réactif, sinon le degré, du moins l'existence de l'intoxication, par ingestion d'organo-phosphorés à activité anticholinestérasique semblable à celle de la Prostigmine.

Nous avons donc choisi, pour cette deuxième partie de notre expérimentation, un organo-phosphoré antiparasitaire à usage vétérinaire très répandu : le " Galloxon Roussel " que nous avons défini précédemment.

2) Mesure de l'activité cholinestérasique d'un cheval après ingestion d'un organo-phosphoré.

a) Matériel et technique : Nous avons repris le même cheval un mois et demi après notre précédente expérimentation à la Prostigmine. Nous étant assuré qu'il était en excellente santé, et après lui avoir fait subir une diète hydrique de 24 heures, nous lui avons fait absorber, à l'aide d'une sonde naso-oesophagienne, une quantité de " Galloxon Roussel ", égale à la dose thérapeutique pour bovins de 300 Kg, soit : 11 g. Le " Galloxon Roussel " se présentant sous forme de poudre mouillable, contenant 77 % d'Haloxon, nous avons dilué les 11 g. de celle-ci dans 150 ml d'eau distillée, comme le prescrit le mode d'emploi.

Le dosage de l'activité cholinestérasique sérique, dans les heures suivant l'ingestion, nous a indiqué des variations d'activité infimes ; la quantité d'organo-phosphoré absorbée étant donc trop faible pour entraîner une variation notable d'activité. La tolérance de l'Haloxon est assez grande, comme l'indique la documentation des Laboratoires Roussel.

La DL₅₀ chez le rat est de 900 mg/kg. Des agneaux supportent fort bien des doses 6 fois supérieures à la dose thérapeutique, et ils ne présentent aucun effet secondaire après l'absorption hebdomadaire de 100 mg/Kg de poids vif pendant 20 semaines consécutives.

Compte tenu de ces indications, nous avons décidé de prendre un risque minime, en faisant absorber, peu de temps après, au même cheval, et suivant le même processus, une dose de " Galloxon Roussel " égale à environ 4 fois la dose

thérapeutique pour bovins de 300 Kg, soit 44 g. . dilués dans 600 ml d'eau distillée; dose qui représentait pour un cheval de 440 Kg, 100 mg de " Galloxon Roussel " par Kg de poids vif.

Le sondage naso-oesophagien étant effectué, un trocard est mis en place dans la veine jugulaire du cheval, afin de permettre des prélèvements de sang multiples, aux heures choisies.

Le premier prélèvement est fait, avec la mise en place du trocard, à 9 heures du matin, le 1er jour (c'est le temps 0 de l'expérimentation), puis toutes les heures jusqu'à 15 heures, puis toutes les deux heures jusqu'à 23 heures.

Le 2ème jour, nous faisons encore 3 prélèvements. Les 3ème, 4ème, 5ème, 6ème, 9ème, 11ème et 14ème jours suivants, nous n'en faisons plus qu'un par jour, comme l'indique le tableau ci-après.

Chaque fois, nous avons opéré nos deux mesures de l'activité cholinestérasique sérique, successivement par la méthode de HANSSON et la méthode au papier réactif, dans l'heure suivant le prélèvement de sang.

L'observation de l'animal, dans les heures qui ont suivi l'ingestion du " Galloxon Roussel " nous a permis de remarquer une légère somnolence de l'animal, sans autre signe bien net.

Au temps 0, défini précédemment, le Δ pH à 30 minutes était de 0,90 et le temps de virage du papier à la couleur de référence, de 20 minutes environ.

à <u>10 heures</u>	(Δ pH 30'	=	0,61
	(papier	=	28'
à <u>11 heures</u>	(Δ pH "	=	0,36
	(papier	=	30'
à <u>12 heures</u>	("	=	0,28
	("	=	31'
à <u>13 heures</u>	("	=	0,26
	("	=	34'
à <u>14 heures</u>	("	=	0,25
	("	=	35'
à <u>15 heures</u>	("	=	0,23
	("	=	31'
à <u>17 heures</u>	("	=	0,18
	("	=	40'
à <u>19 heures</u>	(Δ pH 30'	=	0,22
	(papier	=	37'
à <u>21 heures</u>	("	=	0,22
	("	=	36'

à <u>23 heures</u>	("	=	0,25
	("	=	37'

Le lendemain, 17 septembre, nous poursuivions nos dosages

à <u>8 heures</u>	(Δ ph 30'	=	0,40
	(papier	=	32'

à 11 heures une mesure nous parut assez paradoxale:

elle donnait :	(Δ pH 30'	=	0,23
	(papier	=	36'

nous avons dû commettre une erreur de manipulation.

à <u>15 heures</u>	("	=	0,42
	("	=	31'

<u>Le 18 Septembre</u>	("	=	0,43
	("	=	31'

<u>Le 19 Septembre</u>	("	=	0,54
	("	=	30'

<u>Le 20 Septembre</u>	("	=	0,61
	("	=	29'

<u>Le 21 Septembre</u>	("	=	0,64
	("	=	26'

<u>Le 24 Septembre</u>	("	=	0,65
	("	=	26'

<u>Le 26 Septembre</u>	("	=	0,70
	("	=	25'

<u>Le 29 Septembre</u>	("	=	0,77
	("	=	23'

Nous avons arrêté là nos mesures, puisque nous retrouvions alors, approximativement, les chiffres moyens d'activité cholinestérasique sérique établis précédemment.



b) Résultats comparés : nous obtenons une courbe sensiblement semblable à celle déjà tracée lors de notre expérimentation à la Prostigmine.

L'activité cholinestérasique est la plus faible au cours de la 7ème et la 8ème heure suivant l'ingestion de l'organo-phosphoré et ne retrouve ensuite sa valeur initiale que très lentement, en plusieurs jours.

c) Observations : Au cours de cette expérimentation :

- Nous n'avons pas observé de troubles notables chez ce cheval, si ce n'est une légère somnolence, le premier jour.
 - Lors des mesures, nous avons été surpris par la vitesse avec laquelle nous obtenions les premiers signes d'abaissement de l'activité cholinestérasique, après l'ingestion de " Galloxon Roussel ". En effet, dès la première heure, nous avons noté un abaissement très sensible de cette activité.
-

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Les expériences effectuées méthodiquement et les observations qu'elles ont entraînées permettent d'aboutir aux conclusions suivantes:

- Un organo-phosphoré ingéré par un cheval en bonne santé, à une dose peu toxique, ne déclenchant aucun trouble, maladie ou malaise, est facilement décelable par le dosage de l'activité cholinestérasique sérique, grâce au papier réactif.

Par voie de conséquence, son ingestion à dose toxique est encore plus aisément décelable.

Pratiquement, il convient de retenir que : c'est aux environs de la 7ème à la 8ème heure que le plus fort abaissement de l'activité cholinestérasique est obtenu, abaissement nettement décelable dès la 3ème à la 4ème heure suivant l'ingestion de l'organo-phosphoré.

A ce moment-là, le temps mis par le papier, pour virer à la couleur de référence, se situe autour de 40 minutes.

Par conséquent, au moins 8 heures après l'ingestion d'un organo-phosphoré (insecticide, anthelmintique, ou organo-phosphoré utilisé en agriculture), le diagnostic d'intoxication chez le cheval est possible par l'épreuve sur papier réactif, lorsque le virage de celui-ci à la couleur de référence s'effectue après 35 minutes. Le diagnostic étant renforcé, lorsque le virage intervient plus tardivement.

- L'épreuve au papier réactif est malgré tout assez imprécise, car d'une part, il est assez difficile d'apprécier le virage à 30 secondes près, parfois même à une minute près, pour les activités faibles, puisqu'un facteur personnel conditionne alors l'appréciation du virage et, d'autre part, bien qu'on puisse s'en protéger, l'influence de la température ambiante est très nette et est susceptible de jouer un rôle important dans la vitesse de la réaction enzymatique. Ces facteurs d'imprécision ne doivent donc pas être ignorés du Praticien, utilisant la méthode au papier réactif comme " épreuve de campagne ", au cours des différentes saisons. Toutefois, celle-ci, bien que sommaire et sans grande précision, peut être valablement retenue dans les limites que nous avons établies. si l'opérateur s'astreint à se placer dans les conditions indispensables au déroulement normal de la réaction enzymatique.

La méthode au papier réactif doit être considérée, non pas comme un moyen d'investigation diagnostique, mais comme un procédé confirmatif de suspicion, basé, avant tout signe clinique, sur les commémoratifs.

Cette épreuve, qui ne saurait être étendue au-delà des limites de l'expérimentation poursuivie uniquement sur le cheval, a ainsi pour elle, l'avantage essentiellement pratique, d'être rapide et de ne nécessiter qu'un matériel à la portée de tous.

Vu:

LE DIRECTEUR
de l'Ecole Nationale Vétérinaire
de LYON,

Professeur FLORIO

LE PROFESSEUR RESPONSABLE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire,

Professeur FLORIO

Vu :

LE DOYEN,
Pour le Doyen,
l'Assesseur,
Louis REVOL

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 2 novembre 1965

LE RECTEUR, PRESIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITE,
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

B I B L I O G R A P H I E

- 1 . ALLES (G) and HAWES (R) : Jour. of Biol. Chem. 1940, 133, 375 - cités par CHARY (8) .
- 2 . AMMON (R) : Die cholinesterase. Erg. Enzym. Forschung 1935, 4 , 102 - cité par CHARY (8).
- 3 . ANTOPOL (W), TUCHMAN (L), and SHIFRIN (A) : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1937, 36, 46 ; et 1938, 38, 363 - cités par VINCENT (60).
- 4 . AUGUSTINSSON (K.B.) : Cholinestérases - Interscience Publishers Inc. New-York, 1957, 5, i , 63.
- 5 . BERGMANN (F) : La structure fine des cholinestérases et le rôle de ces enzymes dans la conduction nerveuse. Exposés annuels de Biochimie médicale - 1959 , 21, 1, 16.
- 6 . BROWN (N.C.), HOLLINSHEAD (D.T.), KINGSBURY (P.A.), MALONE (J.C.) : Une nouvelle classe de composés présentant des propriétés anthelminthiques. Nature 1962, 194, 379.
- 7 . CHAMBON (M) : Aspects toxicologiques de la manipulation des insecticides organo-phosphorés - Journal de médecine de Bordeaux 1957, 5, 642 - 648.
- 8 . CHARY (R), BOCQUET (P), JAYOT (R) : Cholinestérases et anticholinestérases : leur intérêt en médecine vétérinaire. Revue de pathologie générale et de physiologie clinique, 1961, N° 733, 1251 - 1322.
- 9 . CHARY (R), JAYOT (R), BOCQUET (P) : Valeurs comparées des activités cholinestérasiques sanguines dans quelques espèces animales. Bull. Acad. Vét. 1959, 112, 225 - 233.
- 11 . CHARY (R) : Les organo-phosphorés anticholinestérasiques (insecticides, anthelminthiques dans la thérapeutique animale. Extrait de Economie et Médecine animales 1963, 4, 238 - 260 .
- 12 . CHEYMOL (J), CHABRIER (P), CARAYON-GENTIL (A) : Propriétés pharmacodynamiques des dérivés de synthèse de l'acide orthophosphorique. Bio. Méd. 1963, N° 5, 52, 527 - 570.
- 13 . CIXOUS (J) : Propriétés pharmacodynamiques et anthelminthiques des composés organo-phosphorés. (Thèse doctorat vétérinaire Paris 1962) . (Imprimerie " Au Manuscrit " - 10, Rue Paul Bert - ALFORT).
- 14 . COX (D.H.) et BAKER (B.R.) : A diagnostic test for organic phosphate insecticidal poisoning of cattle. J. Amer. vet. Med. Assoc. 1958, 132, 9, 385.
- 15 . DARRASPEN (E), FLORIO (R) et MAZIERE (C) : Cholinestérase sérique et insuffisance hépatique du cheval et du chien. CR. Soc. Biol. 1952, 146, 1725.
- 16 . DELAUNOIS et CASIER : 1946 : cités par CHARY (8).
- 17 . DELCOURT (A) et VAN DER HOEDEN (R) : Acta gastroentérol. Belg. 1954, 17, 102, - cités par VINCENT (60).
- 18 . DESVIGNES (L) et KOPILLOF (M) : Activité cholinestérasiqque du plasma sanguin chez les glaucomateux. Presse Méd. 1959, 67, N° 12, 468.
- 19 . DIGGLE et GAGE : 1951 : cités par O. BRIEN (39).
- 20 . EUZEBY (J) : Thérapeutique anthelminthique des " Strongyloses " gastro-intestinales des ruminants. Rev. Med. Vet. 1963, 114, 278 - 289.
- 21 . FABER (M) : Serum cholinesterase in disease. Acta. Med. Scand. 1942, 114, 59 - 71.
- 22 . FIESSINGER (N), GLOMAUD (C), CARLOTTI (J) : La cholinestérase dans les affections hépatiques. Bull. Acad. Méd. 1944, 128, 293.
- 23 . FLEISHER (J.H.), POPE (E.J.), et SPEAR (S.F.) : Arch. Ind. Health. USA. 1955, 11, 332 - 337. cités par CHARY (8).
- 24 . FRAWLEY (J.P.), HAGAN (E.G.), FITZHUGH (O.G.) : Pharmacol. Exp. Therap. 1952, 105, 156 . cités par CHARY (8).
- 25 . GAJDOS (A) : L'estérase du sérum sanguin. Exposés annuels de Bioch. Méd. 1950, 11, 203.
- 26 . GLASSON (B) et MUTRUX (S) : Etude des cholinestérases du sang et du liquide céphalo-rachidien dans différents syndromes psychiatriques. Presse médicale 1947, N° 20, 230.
- 27 . GLICK (D) : Methods of Biochemical Analysis - 1937.
- 28 . GRIETEN (J), GEREBTZOFF (M.A.) : Apparition de cholinestérase au cours de la maturation des spermatozoïdes du cobaye. C.R. Soc. Biol. 1956, 150, 1015.

29. HALL (G) et LUCAS (C) : J. Pharmacol. 1937, 59, 29. cités par : CHARY (8).
30. HANSSON (C.H.) : Acta Pharmacol. et toxicol. 1956, 12, 142 et 1957, 13, 142 - 154. cité par CHARY
31. HESTRIN (S) : J. Biol. Chem. 1949, 180, 249. cité par CHARY (8).
32. HEYMANS (C) : Exp. Ann. Bioch. Med. 1951, 12, 21. cité par CHARY (8).
33. KERWICK (S) : Biochem. jour. 1960, 76, 420. cité par VINCENT (60).
34. LABORIT (H) et MORAND (P) : La recherche de l'activité cholinestérasique et ses conséquences en clinique. L'anaphylaxie vue sous le jour de l'activité cholinestérasique. Presse médicale. 1946, 54, N° 7, 106.
35. LEVY (J) : Les cholinestérases. Jour. de Physiol. 1947, 39, 413 - 458.
36. LIMPEROS (G) et RANTA (K.E.) : Science 1953, 117, 453. cités par CHARY (8).
37. LOEWI (O) und NAVRATIL (E) : Pflügers Arch. ges. physiol. 1926, 214, 678. cités par RUCKEBUSCH et JOUBERT (45).
38. MICHEL (H.O.) : J. Lab. Clin. Med. 1949, 34, 1464. cité par CHARY (8).
39. O. BRIEN (R.D.) : Toxic phosphorus esters chemistry, metabolism, and Biological Effects. Academic Press. Inc. New-York and London, 1960, 434 p.
40. PAGET (M) et DHELLEMMES (G) : Annales Biol. Clin. 1947, 5, 380. cités par VINCENT (60).
41. PLATTNER : 1926. cité par CHARY (8).
42. RADELEFF (R.D.) : Toxicity studies of Bayer 21/199 in Livestock. J.A.V.M.A. 1963, 142, 624 - 631.
43. RICHTERLICH (R) : Schweiz. Med. Wschr. 1962, 92, N° 9, 263 - 265. cité par VINCENT (59).
44. RUCKEBUSCH (Y) et RUCKEBUSCH (M) : Mesure de l'activité cholinestérasique du sang chez les animaux domestiques. Rev. Méd. Vét. 1959, 110, 627.
45. RUCKEBUSCH (Y et M) et JOUBERT (L) : Activité cholinestérasique érythrocytaire et plasmatique chez le porc : Nutrition et infection. Arch. Int. Pharmacodyn. 1960, 124, 495.
46. RUCKEBUSCH (Y) et MAGAT (A) : Diagnostic au laboratoire de l'intoxication des bovins par les insecticides organo-phosphorés. Adaptation de la technique d'Hestrin. Fiche technique, Syndic. Nat. Vét. 1961, 40, N° 3, 111 - IV.
47. RUCKEBUSCH (Y) et RUCKEBUSCH (M) : Sur le système acétylcholine-cholinestérase et la pharmacologie des insecticides organo-phosphorés. Cahiers de méd.vét. 1961, 30, 126 - 151.
48. RUCKEBUSCH (Y) et MAGAT (A) : Diagnostic de l'intoxication des ruminants par les composés organo-phosphorés. Rev. Méd. Vét. 1962, 113, 12, 824 - 834.
49. SAILER (S) und BRAUNSTEINER (H) : cités par VINCENT (59).
50. SCHAUMANN (W) : Intoxication par le Parathion, son traitement. Dt. Apotheker Ztg. 1959, 99, 1101 - 1104.
51. SCHRADER (G) : cité par CHEYMOL (12).
52. STEDMAN (E) STEDMAN (E) and EASSON (L) : Biochem. jour. 1932, 26, 2056. cités par VINCENT. (60).
53. STEDMAN (E) : Cholinesterases as enzymes. Chem. Indust. G.R. 1954 - 414.
54. TAPERNOUX (A) et MAGAT (A) : Notions sur la physicochimie et la biochimie des insecticides organo-phosphorés. Cahiers de Méd. Vét. 1961, 30, 101 - 125.
55. TAPERNOUX (A) et PERROT (L) : Réflexions sur la toxicité de quelques composés organo-phosphorés. Rev. Méd. Vét. 1963, 114, 262 - 268.
56. TAPERNOUX (A) et MAGAT (A) : Observations sur l'emploi du Ronnel pour le traitement interne de l'hypodermose bovine. Rev. Méd. Vét. 1961, 112, 561 - 570.
57. TRUHAUT (R) et VERNIN (H) : Ann. Biol. Clin. 1964, 22, 3-4, 419 - 428.
58. VINCENT (D), SEGONZAC (G), MARQUES-VINCENT (M.C.) : Sur la détermination de la cholinestérase sérique par la méthode au papier réactif. Ann. Biol. Clin. 1963, 21, 5-6, 481 - 490.
59. VINCENT (D), SEGONZAC (G), MARQUES-VINCENT (M.C.) : Sur la détermination de la cholinestérase sérique par la méthode du papier réactif. Ann. Biol. Clin. 1963, 21, 5-6, 481 - 490.
60. VINCENT (D) : Les cholinestérases chez l'Homme. Revue de Pathologie générale et de Physiologie clinique - 1962, N° 733, 1217 - 1248.
61. VINCENT (D) et DE PRAT (J) : Recherches préliminaires sur la cholinestérase du sérum dans les syndromes d'insuffisance hépatique. CR. Soc. Biol. 1942, 136, 821.

62. VINCENT (D), SEGONZAC (G) et DE PRAT (J) : Ann. Biol. Clin. 1944, 2, 35. cités par CHARY (8).
63. VINCENT (D) : Acétylcholine - cholinestérases et anticholinestérases. Prod. Pharmaceut. 1955, 10, 17 - 24, et 85 - 97.
64. WILSON (IB) et BERGMANN (F) : J. Biol. Chem. 1950, 185, 479-489 . cités par CHEYMOL (12).
-

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION - Généralités sur les Cholinestérases	13
--	----

PREMIERE PARTIE

Intérêt du dosage des Cholinestérases d'un point de vue général et plus particulièrement en médecine vétérinaire, lors d'intoxications - Action des Organo-Phosphorés.

A) Intérêt du dosage d'un point de vue général	17
B) Intérêt du dosage en médecine vétérinaire	17
1) - D'un point de vue expérimental	17
2) - D'un point de vue toxicologique	18
C) Les Organo-Phosphorés; leur action	19
1) - Propriétés générales et toxicité	19
2) - Absorption et destinée métabolique chez l'animal	20
3) - Mécanisme d'action sur les cholinestérases	21
4) - Symptomatologie des intoxications par les organo-phosphorés	22
a) - Généralités	22
b) - Symptômes	22

DEUXIEME PARTIE

Méthodes de détermination de l'activité cholinestérasique.

A) Choix d'une méthode	27
1) - Méthode colorimétrique à l'hydroxylamine et au perchlorure de fer	29
2) - Méthode potentiométrique de Michel (1949)	29
3) - Méthodes pHcolorimétriques	29
B) Méthode choisie	29
1) - Principe de la méthode	30

2) - Réactifs	31
3) - Mode opératoire	31
4) - Mode d'expression des résultats	32

TROISIEME PARTIE

Expérimentation

A) Principe et mode d'utilisation du papier réactif	36
B) Estimation de l'activité cholinestérasique sérique normale du cheval	36
1) - Dosage par la méthode électrophMétrique	37
2) - Estimation comparée à l'aide du papier réactif	38
3) - Résultats comparés	41
C) Mesure de l'activité cholinestérasique sérique après action d'un anticholines- térasique	41
1) - Mesure de l'activité cholinestérasique sérique d'un cheval après une injection de Prostigmine	42
a) Matériel et technique	42
b) Résultats comparés	43
2) - Mesure de l'activité cholinestérasique sérique d'un cheval après ingestion d'un organo-phosphoré	44
a) Matériel et technique	44
b) Résultats comparés	48
c) Observations	48
CONCLUSIONS	51
BIBLIOGRAPHIE	55
TABLE DES MATIERES	61

Éditions F.O.T.
LYON
1965

